

3



19 BUNDESREPUB
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 49 527 A 1

51 Int. Cl.⁷:
C 07 H 21/00

21 Aktenzeichen: 100 49 527.3
22 Anmeldetag: 6. 10. 2000
43 Offenlegungstag: 6. 9. 2001

DE 100 49 527 A 1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

71 Anmelder:
FRIZ Biochem GmbH, 80639 München, DE

74 Vertreter:
Kritzenberger, J., Dipl.-Chem.Univ. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anw., 80637 München

72 Erfinder:
Hartwich, Gerhard, Dr., 80639 München, DE;
Bandilla, Michael, Dr., 82234 Weßling, DE

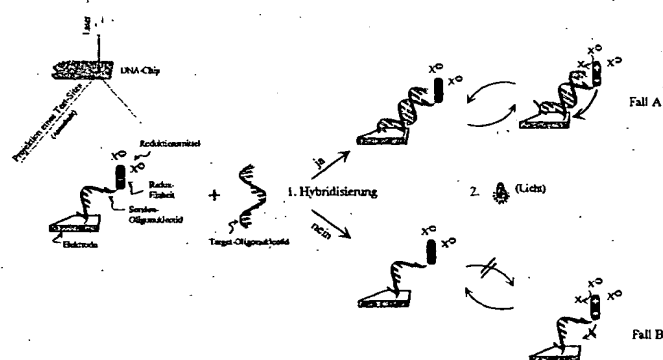
56 Entgegenhaltungen:
US 60 96 273
US 60 63 573
US 58 24 473
WO 01 21 635 A2
WO 00 42 217 A2
WO 00 31 101 A1
J. Amer. Chem. Soc. 121(1999)769-774;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Oligomer, das durch chemische Bindung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifiziert ist. Dieses modifizierte Nukleinsäure-Oligomer kann in einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen verwendet werden. Das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer wird mit einem Ende an eine leitfähige Oberfläche gebunden und trägt am anderen, freien Ende die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit. Durch Behandlung mit der zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung (Target) wird ein Teil der Einzelstrang-Oligonukleotide hybridisiert, wodurch die ursprünglich nicht oder nur schwach vorhandene elektrische Kommunikation zwischen der leitfähigen Oberfläche und der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erhöht wird. Somit wird die Detektion eines Hybridisierungsereignisses durch elektrochemische Verfahren wie Voltametrie, Amperometrie oder Leitfähigkeitsmessung ermöglicht.



DE 100 49 527 A 1

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Oligomer, das durch chemische Bindung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifiziert ist.

Stand der Technik

- 10 In der WO 00/42217 wird ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäureoligomerhybridisierungsereignissen beschrieben, bei dem der Unterschied der Leitfähigkeit von Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomer und Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer das entscheidende Kriterium für die Detektion eines Hybridisierungsereignisses darstellt. Bei geeigneter Anordnung des Nukleinsäure-Oligomers als Teil einer elektrochemischen Zelle kann der Leitfähigkeitsunterschied als "molekularer Schalter" innerhalb eines ansonsten geschlossenen Stromkreises verwendet werden. Im nicht-hybridisierten Zustand (als Einzelstrang) fungiert das Nukleinsäure-Oligomer als offener Schalter, bei Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang ist der Schalter geschlossen.

- 15 Eine molekulare Anordnung zur Detektion von Hybridisierungsereignissen gemäß der WO 00/42217 ist in Fig. 1 dargestellt. Die Sonden-Oligonukleotide der einzelnen Test-Sites (dots mit Sonden-Oligonukleotiden identischer Sequenz) sind auf einer Elektrode immobilisiert, am freien Ende der Sonden-Oligonukleotide wird eine "Redox-Einheit" als Elektromarkierung kovalent an die Sonden-Oligonukleotide gebunden.

- 20 Die Redox-Einheit (Elektromarkierung), z. B. ein Komplex aus Elektron-Donor "D" und Elektron-Akzeptor "A" wird extern durch Licht zur Ladungstrennung angeregt. Dabei wird ein Elektron vom Donor auf den Akzeptor übertragen und es entsteht ein ladungstrennter Zustand D^+A^- ("+" -" in Fig. 1). Die Leitfähigkeit des hybridisierten Sonden-Oligonukleotids ist hoch, d. h. ein Elektron kann, bei geeignetem Elektrodenpotential, von A^- auf die Elektrode übertragen und detektiert werden. Bei Gegenwart eines löslichen Reduktionsmittels X^- , das D^+ zu D reduziert, wird die Redox-Einheit in den Zustand vor Lichtabsorption versetzt. Weitere Lichtabsorption startet den Zyklus erneut und erzeugt einen deutlichen Strom (Fall A). Die Leitfähigkeit des Sonden-Oligonukleotids ohne komplementäres Target ist dagegen gering, das Elektron kann nicht von A^- auf die Elektrode übertragen werden, der Zyklus ist unterbrochen, es fließt kein Strom (Fall B).

- 30 Es liegen also sozusagen zwei Schalter im Stromkreis vor. Den ersten Schalter stellt die Elektromarkierung dar, der durch Lichteinstrahlung geschlossen werden kann. Der zweite Schalter ist durch das Sonden-Oligonukleotid verwicklicht und wird durch Hybridisierung mit dem passenden Target geschlossen. Nur wenn beide Schalter geschlossen sind, fließt Strom. Diese Kombination ermöglicht es, die einzelnen Test-Sites optisch zu adressieren und elektrisch auszulesen. Nur die Test-Sites, bei denen z. B. über eine Laser-Anregung der erste Schalter geschlossen ist, werden angesprochen (adressiert) und Hybridisierungsereignisse (geschlossener zweiter Schalter) im beleuchteten Segment registriert. Folglich sind keine einzeln adressierbaren Mikroelektroden für die jeweiligen Test-Sites notwendig, sondern es können alle Test-Sites auf einer durchgängigen, elektrisch leitenden Oberfläche aufgebracht werden.

- 35 Gemäß der WO 00/42217 wird z. B. Thiol-modifizierte ss-DNA über self-assembled monolayer (SAM) auf Goldoberflächen kovalent immobilisiert (Ausbildung von Au-S-Oligo auf 100 nm Gold (111) auf Muskovit). Die ss-DNA trägt am freien Ende eine Amino-Gruppe über die eine "regenerierbare, lichtadressierbare Elektronenpumpe" gebunden wird. Als "regenerierbare, lichtadressierbare Elektronenpumpe" kann ein photosynthetisches Reaktionszentrum (RC), z. B. dasjenige der Purpurbakterien von Rb. sphaeroides, verwendet werden. Solche RCs bestehen im Wesentlichen aus Proteinmatrix, eingebettetem Elektronendonator P und eingebettetem Elektronakzeptor Q. Durch Lichtinduktion kommt es zur Ladungstrennung P^+Q^- , wobei P^+ z. B. durch lösliches externes Cytochrom rereduziert werden kann (somit entspricht RC der Redoxeinheit und Cytochrom dem X^- in Fig. 1). Durch die Absorption von Licht zur photoinduzierten Ladungstrennung wird dem System PQ zusätzliche Energie bereit gestellt, die dazu ausreicht, dass Q^- leichter reduziert wird als Cytochrom, womit eine interferierende Reaktion des Cytochroms an der Elektrode ausgeschlossen ist. Das Reaktionszentrum kann in einer einfachen Manipulation in die beiden Bestandteile Q und Q-freie RCs zerlegt werden. Damit ist die Anbindung der RC-Einheit an die immobilisierte ss-DNA in zwei einfachen Schritten durchzuführen: Anbindung des Chinons und Rekonstitution des Q-freien RC-Komplexes an das angebundene Chinon. Die RCs bieten einige inherente Vorteile: Zum einen liegt die Quantenausbeute der photoinduzierten Ladungstrennung (Effizienz des Schalters eins) bei mehr als 99% (Wraight et al., Biochimica Biophysica Acta (1974), 333, 246-260), zum anderen sind die an der photoinduzierten Ladungstrennung beteiligten Kofaktoren in eine Proteinmatrix eingebettet, die elektrisch isolierend wirkt, womit auch bei direktem Kontakt des RCs mit der Elektrode ein "Kurzschluss" (Elektrontransfer von Q^- direkt auf die Elektrode ohne den "Umweg" über die DNA) verhindert wird. Daneben sind die "Schaltzeiten" enorm kurz (photoinduzierte Ladungstrennung zu P^+Q^- innerhalb von 100 ps, die Rereduktion des P^+ durch Cytochrom in ca. 1 μ s) und das System ist "natürlicherweise" dazu geeignet, nahezu beliebig viele photoinduzierte Elektrontransfer-Zyklen zu durchlaufen.

- 55 Diese amperometrische Detektion gemäß WO 00/42217 bietet mehrere Vorteile: Sie ist apparativ wenig aufwendig und damit weniger kostenintensiv als z. B. ein Fluoreszenzbasiertes Ausleseprinzip. Unspezifische Adsorption von Target-Oligonukleotiden, die bei der Fluoreszenz-basierten Detektion große Probleme verursachen, spielen nahezu keine Rolle und eventuell auftretender unspezifischer Untergrund-Strom kann durch Messung des Differenzsignals aus Strom bei Beleuchtung und Strom ohne Beleuchtung eliminiert werden, wodurch der Einfluss anderer Zellbestandteile unterdrückt werden kann und eine vorherige Isolierung der DNA bzw. RNA entfällt.

- 60 Bekannt ist auch, dass die Hybridisierungsbedingungen über die Kombination aus üblicher Temperaturmodulation und Elektrostringenz optimiert werden können. Ein schnellerer und spezifischerer Hybridisierungsvorgang wird erreicht, wenn neben der Temperatur auch das Elektrodenpotential moduliert wird, um das poly-anionische Komplement des Sonden-Oligonukleotids, das aufgrund von Basenfehlpaarungen weniger stark gebunden ist, zu dehybridisieren. Basenfehlpaarungen können in situ erkannt werden, da das Elektrodenpotential, das zum Elektrontransfer über ds-DNA mit einer

Basenfehlpaarung notwendig ist gegenüber der Situation einer perfekt hybridisierten DNA deutlich erhöht ist (Hartwich et al., Journal of the American Chemical Society (1999), 121, 10803-10812), die Fluoreszenz-basierte Detektion dagegen ist bezüglich Basenfehlpaarungen völlig unsensitiv.

Für eine stringente Hybridisierung zwischen Sonden und Target-Oligonukleotid, i. e. zum Ausschluss von Hybriden bei denen das an die Sonde hybridisierte Nukleinsäure-Oligomer eine oder mehrere nicht-komplementäre Basen umfasst, ist es im Allgemeinen notwendig den Hybridisierungsvorgang über mehrere Stunden wenige Grad unter der nach Bolton and McCarthy (1962) berechneten Schmelztemperatur für das Hybrid aus Sonden- und Target-Oligonukleotid stattfinden zu lassen oder Temperaturzyklen zu fahren, bei denen die Temperatur im Intervall zwischen Raumtemperatur und einem Hochtemperaturlimit T_h , das wenige Grad unter der berechneten Schmelztemperatur für das Hybrid aus Sonden- und Target-Oligonukleotid liegt, variiert wird.

Die in der WO 00/42217 vorgeschlagene Verwendung von photosynthetischen Reaktionszentren, wie z. B. derjenigen der Purpurbakterien von *Rb. sphaeroides*, als Elektromarkierung zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsergebnissen weist den Nachteil auf, dass die thermische Stabilität dieser Protein-Pigment-Komplexe nicht all zu hoch ist. Insbesondere kann es vorkommen, dass beim Hybridisierungsvorgang ein Teil der thermolabilen Reaktionszentren zerstört wird.

Darstellung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, modifizierte Nukleinsäure-Oligomere bereitzustellen, die zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden verwendet werden können und die die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer gemäß unabhängigem Patentanspruch 1 und dessen Verwendung gemäß unabhängigem Anspruch 11 gelöst.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

DNA = Desoxyribonukleinsäure

RNA = Ribonukleinsäure

PNA = Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA; bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2-Base)-CH_2CO-$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA.)

A = Adenin

G = Guanin

C = Cytosin

T = Thymin

U = Uracil

Base = A, G, T, C oder U

Bp = Basenpaar

Nukleinsäure = wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.

Nukleinsäure-Oligomer = Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- und/oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).

Oligomer = Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.

Oligonukleotid = Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.

Oligo = Abkürzung für Oligonukleotid.

Mismatch = Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.

ss = single strand (Einzelstrang)

ds = double strand (Doppelstrang)

Elektron-Donor = Der Begriff Elektron-Donor bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung einen Bestandteil der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Bei einem Elektron-Donor handelt es sich um ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände ein Elektron an einen Elektron-Akzeptor transferieren kann. Ein solcher äußerer Umstand ist z. B. die Lichtabsorption durch den Elektron-Donor oder -Akzeptor einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Durch Einstrahlung von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge gibt der Elektron-Donor "D" an den/einen Elektron-Akzeptor "A" ein Elektron ab und es bildet sich, zumindest temporär, ein ladungsgetrennter Zustand D^+A^- aus oxidiertem Donor und reduziertem Akzeptor. Die Fähigkeit als Elektron-Donor oder -Akzeptor zu wirken ist relativ, d. h. ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände gegenüber einem anderen Molekül als Elektron-Donor wirkt, kann gegenüber diesem Molekül unter abweichenden experimentellen Bedingungen oder gegenüber einem dritten Molekül unter gleichen oder abweichenden experimentellen Bedingungen auch als Elektron-Akzeptor wirken.

Elektron-Akzeptor = Der Begriff Elektron-Akzeptor bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung einen Bestandteil der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Bei einem Elektron-Akzeptor handelt es sich um ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände ein Elektron von einem Elektron-Donor auf-

- nehmen kann. Ein solcher äußerer Umstand ist z. B. die Lichtabsorption durch den Elektron-Donor oder -Akzeptor einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Durch Einstrahlung von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge gibt der Elektron-Donor "D" an den/einen der Elektron-Akzeptor "A" ein Elektron ab und es bildet sich, zumindest temporär, ein ladungstrennter Zustand D^+A^- aus oxidiertem Donor und reduziertem Akzeptor. Die Fähigkeit als Elektron-Akzeptor oder -Donor zu wirken ist relativ, d. h. ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände gegenüber einem anderen Molekül als Elektron-Akzeptor wirkt, kann gegenüber diesem Molekül unter abweichenden experimentellen Bedingungen oder gegenüber einem dritten Molekül unter gleichen oder abweichenden experimentellen Bedingungen auch als Elektron-Donor wirken.
- Elektron-Donor-Molekül = entspricht einem Elektron-Donor.
- Elektron-Akzeptor-Molekül = entspricht einem Elektron-Akzeptor.
- redoxaktive Einheit = Einheit, die ein oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle und ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Moleküle umfasst.
- Oxidationsmittel = chemische Verbindung (chemische Substanz), die durch Aufnahme von Elektronen aus einer anderen chemischen Verbindung (chemischen Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) diese andere chemische Verbindung (chemischen Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) oxidiert. Ein Oxidationsmittel verhält sich analog zu einem Elektron-Akzeptor, wird aber im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Begriff für einen externen, nicht unmittelbar zur thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit gehörigen Elektron-Akzeptor verwendet. Nicht unmittelbar bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Oxidationsmittel entweder eine freie redoxaktive Substanz ist, die nicht an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist, aber mit diesem in Kontakt steht oder dass das Oxidationsmittel kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden ist, jedoch an einer Stelle des Nukleinsäure-Oligomers, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit entfernt ist. Insbesondere kann die Elektrode das Oxidationsmittel darstellen.
- Reduktionsmittel = chemische Verbindung (chemische Substanz), die durch Abgabe von Elektronen an eine andere chemische Verbindung (chemische Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) diese andere chemische Verbindung (chemischen Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) reduziert. Ein Reduktionsmittel verhält sich analog zu einem Elektron-Donor, wird aber im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Begriff für einen externen, nicht unmittelbar zur thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit gehörigen Elektron-Donor verwendet. Nicht unmittelbar bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Reduktionsmittel entweder eine freie redoxaktive Substanz ist, die nicht an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist, aber mit diesem in Kontakt steht oder dass das Reduktionsmittel kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden ist, jedoch an einer Stelle des Nukleinsäure-Oligomers, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit entfernt ist. Insbesondere kann die Elektrode das Reduktionsmittel darstellen.
- photoinduzierbar = photoinduzierbar bedeutet, dass eine gewisse Eigenschaft erst durch Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge entfaltet wird. So entfaltet z. B. die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität, also ihre Eigenschaft, unter bestimmten äußeren Umständen innerhalb der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit eine Ladungstrennung durchzuführen, also z. B. den Zustand D^+A^- auszubilden, und an ein anderes geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder von einem anderen geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen, erst durch Einstrahlen von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge.
- redoxaktiv = redoxaktiv bezeichnet die Eigenschaft einer Einheit unter bestimmten äußeren Umständen an ein geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen bzw. die Eigenschaft einer redoxaktiven Substanz unter bestimmten äußeren Umständen an einen geeigneten Elektron-Akzeptor Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Elektron-Donor Elektronen aufzunehmen.
- freie, redoxaktive Substanz = freies, nicht kovalent mit der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, dem Nukleinsäure-Oligomer oder der leitfähigen Oberfläche verbundenes, aber mit diesen, z. B. über die der modifizierten leitfähigen Oberfläche zugefügte Lösung, in Kontakt stehendes Oxidations- oder Reduktionsmittel, wobei die freie redoxaktive Substanz z. B. ein ungeladenes Molekül, eine beliebige Salz oder ein redoxaktives Protein oder Enzym (Oxydo-reductase) sein kann. Die freie redoxaktive Substanz ist dadurch gekennzeichnet, dass sie den oxidierten Donor (bzw. den reduzierten Akzeptor) der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit rereduzieren (bzw. re-oxidieren) kann. Die freie redoxaktive Substanz ist bei einem Potential ϕ oxidierbar und reduzierbar, wobei ϕ der Bedingung $2,0 \text{ V} \geq \phi \geq -2,0 \text{ V}$ genügt. Das Potential bezieht sich hierbei auf das freie redoxaktive Molekül in einem geeigneten Lösungsmittel, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode. Bevorzugt sind die Potentialbereiche $1,7 \text{ V} \geq \phi \geq -1,7 \text{ V}$ und $1,4 \text{ V} \geq \phi \geq -1,2 \text{ V}$, wobei der Bereich $0,9 \text{ V} \geq \phi \geq -0,7 \text{ V}$, in dem die redoxaktiven Substanzen der Anwendungsbeispiele oxidiert (bzw. reduziert) werden, ganz besonders bevorzugt ist. Geeignet sind, neben den üblichen organischen und anorganischen redoxaktiven Molekülen wie z. B. Hexacyanoferraten, Ferrocenen, Cobaltoceninen und Chinonen, vor allem die Ascorbinsäure (oder das Na^+ Salz davon), $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$, oder Cytochrom c (cyt c) $^{2+}$, eine Gruppe freibeweglicher eisenhaltiger Proteine.
- thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit = Einheit, die ein oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle und ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Moleküle enthält, wobei dieses (diese) Elektron-Donor-Molekül(e) und/oder dieses (diese) Elektron-Akzeptor-Molekül(e) in ein oder mehrere Makromoleküle eingebettet sein können. Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) können untereinander durch eine oder mehrere kovalente oder ionische Bindungen, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, von der-Waals-Brücken, durch π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeptation miteinander verbunden sein, wobei kovalente Verbindungen direkte oder indirekte (z. B. über einen Spacer, nicht aber über ein Nukleinsäure-Oligomer) Verbindungen sein können. Daneben können die Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en), falls sie in ein oder mehrere Makromolekül(e) eingebettet sind, mit dem (den) Makromolekül(en) durch kovalente Anbindung an das (die) Makromolekül(e), durch Einkapseln in passende molekulare Kavitäten (Bindungstaschen) des Makromoleküls (der Makromoleküle), durch ionische Bindun-

gen, Wasserstoff-Brücken-Bindungen, von der-Waals-Brücken, π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeptation zwischen dem(n) Makromolekül(en) und dem(n) Elektron-Donor-Molekül(en) und/oder dem(n) Elektron-Akzeptor-Molekül(en) verbunden sein. Sind mehrere Makromoleküle Bestandteil der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, so kann die Bindung der Makromoleküle untereinander ebenfalls kovalent, ionisch, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, von der-Waals-Brücken, π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeptation erfolgen. Wesentliche Merkmale der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheiten sind neben der Thermostabilität und der Zusammensetzung aus Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) oder aus Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) und Makromolekül(en): (i) die Einheit ist in den Erscheinungsformen "Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) im ursprünglichen bzw. oxidierten oder reduzierten Zustand" stabil und dissoziiert nicht in ihre Bestandteile, (ii) Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) sind nicht über Nukleinsäuren miteinander verbunden und (iii) die Zusammensetzung der Einheit aus Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) oder aus Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) und Makromolekül(en) kann – unabhängig von der Bindung zwischen den Bestandteilen – vom Fachmann erkannt werden, da die Bestandteile prinzipiell auch als Einzelmoleküle vorkommen. Die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit kann z. B. jedes beliebige thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Protein/Enzym sein. Durch Einstrahlung von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge gibt der/ein Elektron-Donor an einen der Elektron-Akzeptoren ein Elektron ab und es bildet sich, zumindest temporär, ein ladungsgetrennter Zustand D^+A^- aus einem oxidierten Donor und einem reduzierten Akzeptor. Dieser Vorgang innerhalb der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheiten wird als photoinduzierte Ladungstrennung bezeichnet. Bei entsprechend gewählten äußeren Umständen entfaltet die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität, also ihre Eigenschaft, an einen geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen, erst im ladungsgetrennten Zustand, da das Reduktionsmittel (bzw. Oxidationsmittel) nur auf den oxidierten Donor (bzw. vom reduzierten Akzeptor) der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit Elektronen überträgt (bzw. aufnimmt), z. B. in Gegenwart eines Reduktionsmittels, das D^+ , jedoch nicht D, reduzieren kann (bzw. in Gegenwart eines Oxidationsmittels das A^- jedoch nicht A, oxidieren kann). Insbesondere kann dieses Oxidations- bzw. Reduktionsmittel auch eine Elektrode sein, wobei die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit erst nach der photoinduzierten Ladungstrennung ein Elektron an eine Elektrode abgeben (bzw. von dieser aufnehmen) kann, z. B. wenn die Elektrode auf ein Potential gesetzt wird, bei dem A^- jedoch nicht A, oxidiert (bzw. D^+ , jedoch nicht D, reduziert) wird. Wird als thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein thermostabiles photosynthetisches Reaktionszentrum verwendet, so handelt es sich im Allgemeinen um einen sogenannten Pigment/Protein-Komplex aus Apoprotein mit mehreren Proteinuntereinheiten und mehreren Cofaktoren (im Beispiel RC sogenannte Pigmente). In solchen Pigment/Protein-Komplexen spielen sich die ersten Schritte der lichtgetriebenen Ladungstrennung der bakteriellen oder pflanzlichen Photosynthese ab. Das RC der Photosynthese betreibenden Bakterien des Stammes *Rhodobacter sphaeroides* z. B. (vgl. Struktur 1) besteht aus drei Protein-Untereinheiten und acht Cofaktoren (Pigmenten). Die Cofaktoren, ein Bakteriochlorophyll-Dimer P, zwei Bakteriochlorophyll-Monomere B_A und B_B , zwei Bakteriopheophytin-Monomere H_A und H_B und zwei Ubichinon-50 (UQ) Moleküle Q_A und Q_B , sind in den jeweiligen Protein-Bindungstaschen (also der P-, B_A - etc. Bindungstasche) lokalisiert.

thermostabiles, photoinduzierbar redoxaktives Protein/Enzym = besteht in der Regel aus sogenanntem Apoprotein und Cofaktoren, den Elektron-Donor(en) und Elektron-Akzeptor(en) im Sinne der vorliegenden Erfindung. Die photoinduzierte Ladungstrennung innerhalb des thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Proteins/Enzyms wird durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge ausgelöst. So sind zum Beispiel im photosynthetischen Reaktionszentrum (reaction center, RC) als Cofaktoren ein primärer Elektron-Donor P und mehrere verschiedene Elektron-Akzeptoren A, darunter auch Quinon-Cofaktor(en) Q, in eine Proteinmatrix eingebettet und bilden so eine "polymolekulare" Einheit (vgl. Struktur 1). Die Einbettung erfolgt in diesem Fall durch Einkapselung der Cofaktoren in passende Kavitäten, sogenannte Bindungstaschen der Proteinmatrix aus mehreren Protein-Untereinheiten. Sowohl die Protein-Untereinheiten als auch die Einkapselung der Cofaktoren in die Proteinmatrix ist im Fall einiger natürlich vorkommender RCs durch nichtkovalente Bindungen realisiert. Bei Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge gibt der primäre Donor ein Elektron an einen der Elektron-Akzeptoren ab und es bildet sich, zumindest temporär, aus den anfänglich neutralen Cofaktoren ein ladungsgetrennter RC-Zustand P^+A^- insbesondere auch der Zustand P^+Q^- .
RC = Reaktionszentrum.

Q_A -Protein-Bindungstasche = Proteinbindungstasche bzw. Proteinumgebung, in der sich der Chinon-Cofaktor Q_A befindet. In RC von z. B. *Rhodobacter sphaeroides* ist der Chinon-Cofaktor Q_A ein Ubichinon-50 (vgl. Struktur 1), ebenso bei den RC aus Chromatien; bei RC aus den Chloroflexaceae ist das Chinon der Q_A -Protein-Bindungstasche ein Menachinon.

Q_A -Bindungstasche = Q_A -Protein-Bindungstasche

Q = allgemein für Chinon (engl. Quinone).

UQ = Ubichinon-50, RC-Cofaktor und temporärer Elektron-Akzeptor z. B. im RC der Photosynthese betreibenden Bakterien aus z. B. *Rhodobacter sphaeroides* oder *Rhodopseudomonas viridis*.

MQ = Menachinon; RC-Cofaktor und temporärer Elektron-Akzeptor z. B. im RC der Photosynthese betreibenden Bakterien aus Chloroflexaceae wie *Chloroflexus aurantiacus*.

(cyt c)²⁺ = reduzierte Form des Cytochrom c, ein frei bewegliches Häm-Protein, das in der bakteriellen Photosynthese in *Rhodobacter sphaeroides* den oxidierten primären Donor P^+ zu P reduziert;

Beispiel für eine redoxaktive Substanz.

EDTA = Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)

sulfo-NHS = N-Hydroxysulfosuccinimid

EDC = (3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid

HEPES = N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]

Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Linker = molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Heteroalkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit den entsprechenden Reaktionspartnern eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1–30, insbesondere der Kettenlänge 1–20, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

Spacer = Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1–30, insbesondere der Kettenlänge 1–20, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.

(n × HS-Spacer)-oligo = Nukleinsäure-Oligomer, an das n Thiofunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei die Spacer jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Thiofunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein und "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

(n × R-S-S-Spacer)-oligo = Nukleinsäure-Oligomer, an das n Disulfidfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei ein beliebiger Rest R die Disulfidfunktion absättigt. Der Spacer zur Anbindung der Disulfidfunktion an das Nukleinsäure-Oligomer kann jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Der Platzhalter n ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo = zwei gleiche oder verschiedene Nukleinsäure-Oligomere, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, wobei die Disulfidbrücke über zwei beliebige Spacer an die Nukleinsäure-Oligomere angebunden ist und die beiden Spacer eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidbrücke und dem jeweiligen Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14 und diese Spacer wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diese durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein können.

Mica = Muskovit-Plättchen, Trägermaterial zum Aufbringen dünner Schichten.
Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-MQ(RC) = Gold-Film auf Mica mit kovalent aufgebracht Monolayer aus derivatisiertem 12Bp Einzelstrang DNA-Oligonukleotid (Sequenz: TAGTCGGAAGCA). Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert, wobei die S-S-Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Die endständige Base Thymin am 5'-Ende des Oligonukleotids ist am C-5 Kohlenstoff mit -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ modifiziert, wobei dieser Rest wiederum über seine freie Aminogruppe durch Amidbildung mit der Carbonsäuregruppe des modifizierten Menachinon-50 (bzw. Menachinon₁₀, 2-Methyl-3-(deca-Isoprenyl)-1,4-Naphtochinon) verbunden ist. Anschließend wird das MQ mit dem restlichen RC rekonstituiert.

Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-MQ(RC) = Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-MQ(RC) hybridisiert mit dem zu ss-oligo (Sequenz: TAGTCGGAAGCA) komplementären Oligonukleotid.

E = Elektrodenpotential, das an der Arbeitselektrode anliegt.

E_{ox} = Potential beim Strom-Maximum der Oxidation einer reversiblen Elektrooxidation oder -reduktion.

i = Stromdichte (Strom pro cm Elektrodenoberfläche)

Cyclovoltametrie = Aufzeichnung einer Strom/Spannungskurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert, ausgehend von einem Potential, bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet bis zu einem Potential, bei dem eine gelöste oder an die Elektrode adsorbierte Spezies oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom und nach Erreichen eines Maximums einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet.

Amperometrie = Aufzeichnung einer Strom/Zeitkurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode z. B. durch einen Potentialsprung auf ein Potential gesetzt, bei dem die Elektrooxidation oder -reduktion einer gelösten oder adsorbierten Spezies stattfindet und der fließende Strom wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Oligomer, das durch chemische Bindung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifiziert ist.

Unter der Thermostabilität einer photoinduzierbar redoxaktive Einheit wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass photoinduzierbar redoxaktive Einheit bei erhöhten Temperaturen von wenigstens 40°C stabil ist. Im Gegensatz dazu neigen nicht thermostabile z. B. Proteine/Enzyme bei erhöhten Temperaturen (Temperaturen über dem physiologischen Temperaturbereich, also über 40°C) dazu zu denaturieren, d. h. ihre Tertiär- und Quartärstruktur bei unversehrter Primär- und Sekundärstruktur irreversibel zu verändern, was im allgemeinen mit einem Verlust der spezifischen Funktion des Proteins/Enzyms einhergeht. Thermostabile Proteine/Enzyme besitzen im allgemeinen eine höhere Denaturierungstemperatur. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden photoinduzierbar redoxaktive Einheiten als thermostabil bis zur Temperatur T_T bezeichnet, wenn nach zweistündiger Erwärmung auf T_T noch mehr als 90% der photoinduzierbar redoxaktiven Einheiten in ihrer erfindungsrelevanten Form funktionsfähig sind, also mehr als 90% der Einheiten ihre Eigenschaft, photoinduzierte Ladungstrennung auszuführen, beibehalten.

Die Verwendung thermostabiler, photoinduzierbar redoxaktiver Einheiten als Markierung zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen bietet den Vorteil, dass die Hybridisierung bei höheren Temperaturen oder – bei Temperaturzyklen – bei höheren Hochtemperaturlimits T_h stattfinden kann und somit die für eine stringente Hybridisierung zwischen Sonden und Target-Oligonukleotid notwendigen Temperaturbedingungen auch an längerkettige (Sonden-) Nukleinsäureoligomere angepasst werden können.

Erfindungsgemäß weist die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit eine thermische Stabilität bis zu einer Temperatur von wenigstens 40°C auf. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit mit einer thermischen Stabilität bis zu einer Temperatur von wenigstens 50°C, ganz besonders bevorzugt bis zu einer Temperatur von wenigstens 60°C.

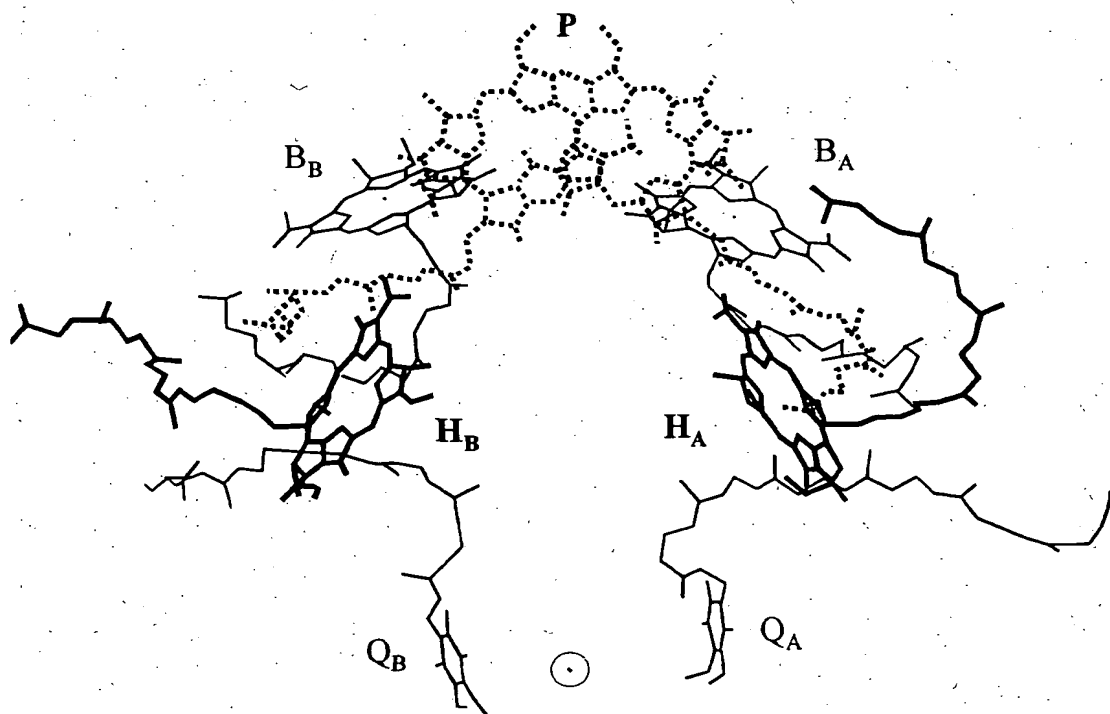
Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit um ein thermostabiles, photoinduzierbar redoxaktives Protein oder Enzym.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform, bei der als thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein thermostabiles, photosynthetisches Reaktionszentrum verwendet wird, wobei insbesondere ein thermostabiles, photosynthetisches bakterielles Reaktionszentrum bevorzugt wird.

Besonders günstige Eigenschaften weisen das Reaktionszentrum der Chloroflexaceae, insbesondere das Reaktionszentrum aus *Chloroflexus aurantiacus*, sowie das Reaktionszentrum der Chromatiaceae, insbesondere das Reaktionszentrum aus *Chromatium tepidum*, auf, wobei es sich hierbei in jedem Fall um thermostabile, photosynthetische bakterielle Reaktionszentren handelt.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung der erfindungsgemäßen modifizierten Nukleinsäure-Oligomere in einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen, bei dem die Detektion bevorzugt cyclovoltametrisch, amperometrisch oder durch Leitfähigkeitsmessung erfolgt.

Struktur 1: Reaktionszentrum bestehend aus den Cofaktoren P (primärer Donor, ein Bakteriochlorophyll Dimer), B_A und B_B (Bakteriochlorophyll Monomere), H_A und H_B (Bakteriopheophytine), Q_A und Q_B (Ubichinon-50) und den Proteinuntereinheiten L, M, und H (nicht gezeigt), die die Cofaktoren einhüllen.



Die thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheiten können nach photoinduzierter Abgabe eines Elektrons an ein externes Oxidationsmittel, z. B. eine Elektrode, oder Aufnahme eines Elektrons von einem externen Reduktionsmittel, z. B. einer Elektrode, durch eine freie redoxaktive Substanz rereduziert bzw. reoxidiert, also in ihren ursprünglichen Zustand zurückversetzt werden.

Als Nukleinsäure-Oligomer wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verbindung aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Nukleotiden oder aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) und/oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin), bevorzugt ein DNA-, RNA- oder PNA-Fragment, verwendet. In der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff Nukleinsäure auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Rückgrat-Strukturen, wie z. B. ein Thio-Phosphat-, ein Dithio-Phosphat- oder ein Phosphoramid-Rückgrat. Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure ist es, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann. Alternativ zu dem Begriff "Nukleinsäure-Oligomer" werden die Begriffe "(Sonden-) Oligonukleotid", "Nukleinsäure" oder "Oligomer" verwendet.

"Photoinduzierbar" heißt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Redoxaktivität der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, also deren Eigenschaft unter bestimmten äußeren Umständen an ein geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen, erst durch

Einstrahlen von Licht bestimmter Wellenlänge entfaltet wird. Durch Einstrahlung von Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge gibt der Elektron-Donor "D" an einen der Elektron-Akzeptoren "A" ein Elektron ab und es bildet sich, zumindest temporär, ein ladungsgetrennter Zustand D^+A^- aus oxidiertem Donor und reduziertem Akzeptor. Dieser Vorgang innerhalb der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit wird als photoinduzierte Ladungstrennung bezeichnet. Bei entsprechend gewählten äußeren Umständen entfaltet die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität erst im ladungsgetrennten Zustand, da das Reduktionsmittel (bzw. das Oxidationsmittel) nur auf den oxidierten Donor (bzw. vom reduzierten Akzeptor) der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit Elektronen übertragen kann (bzw. aufnehmen kann), z. B. in Gegenwart eines Oxidationsmittels, das A^- jedoch nicht A, oxidieren kann (bzw. in Gegenwart eines Reduktionsmittels, das D^+ , jedoch nicht D, reduzieren kann).

Als Oxidations- bzw. Reduktionsmittel kann eine Elektrode fungieren, wobei die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit erst nach der photoinduzierten Ladungstrennung ein Elektron an die Elektrode abgeben (bzw. von dieser aufnehmen) kann, z. B. wenn die Elektrode auf ein Potential gesetzt wird, bei dem A^- jedoch nicht A, oxidiert (bzw. D^+ , jedoch nicht D, reduziert) wird. Daneben kann das Oxidations- bzw. Reduktionsmittel eine freie, redoxaktive Substanz sein, wobei die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit erst nach der photoinduzierten Ladungstrennung ein Elektron an die freie, redoxaktive Substanz abgeben (bzw. von dieser aufnehmen) kann, z. B. wenn die freie redoxaktive Substanz A^- , jedoch nicht A, oxidiert (bzw. D^+ , jedoch nicht D, reduziert).

Unter dem Begriff "modifizierte leitfähige Oberfläche" wird eine leitfähige Oberfläche verstanden, die durch Anbindung eines mit einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifizierten Nukleinsäure-Oligomers modifiziert ist.

Unter Verwendung der erfindungsgemäßen, durch Anbindung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifizierten Nukleinsäure-Oligomere können DNA-/RNA-/PNA-Fragmente in einer Probenlösung durch sequenzspezifische Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierung detektiert werden. Die Detektion der Hybridisierungsereignisse durch elektrische Signale ist eine einfache und kostengünstige Methode und ermöglicht in einer batteriebetriebenen Variante den Einsatz vor Ort.

Die Detektion von Hybridisierungsereignissen auf einem Oligomer-Chip kann durch ein photoadressierbares Ausleseverfahren erfolgen, so z. B. durch Messung elektrischer Signale. Ein photoadressierbares (Oligomer-Chip-) Ausleseverfahren ist ein Verfahren, bei dem die Detektion der Hybridisierungsereignisse auf ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe innerhalb des Gesamtsystems (des kompletten Oligomer-Chips) begrenzt wird, indem Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge zur Induktion der Redoxaktivität der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit räumlich auf diese Test-Site (-Gruppe) fokussiert (begrenzt) wird.

Bindung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer

Die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit wird an ein Nukleinsäure-Oligomer kovalent durch die Reaktion des Nukleinsäure-Oligomers mit der redoxaktiven Einheit oder Teilen davon gebunden. Die Bindung von redoxaktiven Einheiten an ein Nukleinsäure-Oligomer ist in der WO 00/42217 detailliert beschrieben. Sämtliche dort genannten Verfahren können auch zur Bindung der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheiten an ein Nukleinsäure-Oligomer angewendet werden.

Die leitfähige Oberfläche

Das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer ist direkt oder indirekt (über einen Spacer) an eine leitfähige Oberfläche gebunden. Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird jede elektrisch leitfähige Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere Oberflächen aus Metall wie z. B. Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium und Mangan, daneben Oberflächen aus Metallegierungen, sowie dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen, wobei sämtliche Halbleiter als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden können. Beispiele hierfür sind Kohlenstoff, Silizium, Germanium, α -Zinn, Cu(I)- und Ag(I)-Halogenide beliebiger Kristallstruktur. Geeignet sind ebenfalls sämtliche binären Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den Elementen der Gruppen 14 und 16, den Elementen der Gruppen 13 und 15, sowie den Elementen der Gruppen 15 und 16. Daneben können ternäre Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den Elementen der Gruppen 11, 13 und 16 oder den Elementen der Gruppen 12, 13 und 16 verwendet werden. Die Bezeichnungen der Gruppen des Periodensystems der Elemente beziehen sich auf die IUPAC-Empfehlung von 1985. Die leitfähige Oberfläche kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung selbsttragend oder auf einem beliebigen Trägermaterial, wie z. B. Glas, aufgebracht vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Elektrode" alternativ zu "leitfähige Oberfläche" gebraucht.

Bindung eines Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche

Zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen ist es erforderlich, ein Nukleinsäure-Oligomer an eine leitfähige Oberfläche zu binden. Diese Bindung kann direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer leitfähigen Oberfläche der oben beschriebenen Art erfolgen. Die Bindung kann auf drei verschiedene Arten durchgeführt werden:

- Die Oberfläche wird so modifiziert, daß eine reaktive Molekül-Gruppe zugänglich ist. Dies kann durch direkte Derivatisierung der Oberflächenmoleküle, z. B. durch naßchemische oder elektrochemische Oxidation/Reduktion geschehen. Einzelheiten einer solchen Oberflächenmodifikation können der WO 00/42217 entnommen werden.
- Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht werden soll, ist über einen kovalent angeordneten Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge mit einer reaktiven Gruppe modifiziert, wobei

sich die reaktive Gruppe bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befindet. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren können. Einzelheiten der Bindung zwischen reaktiver Gruppe und unmodifizierter Oberfläche können der WO 00/42217 entnommen werden.

c) Als reaktive Gruppe am Nukleinsäure-Oligomer werden die Phosphorsäure-, Thiol-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen des Oligonukleotid-Rückgrats, insbesondere endständige Gruppen, verwendet. Die nötige Kopplungs-Gruppe zur kovalenten Anbindung an die Phosphorsäure-, Thiol-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe ist in diesem Fall ein Teil der Oberflächenderivatisierung mit einer (monomolekularen) Schicht beliebiger Moleküllänge, wie unter a) in diesem Abschnitt beschrieben, oder die Phosphorsäure-, Thiol-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe kann direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren, wie unter b) in diesem Abschnitt beschrieben. Einzelheiten dieser Bindung an die leitfähige Oberfläche können der WO 00/42217 entnommen werden.

Die Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche kann vor oder nach der Anbindung der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer erfolgen. Im Falle eines thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Proteins/Enzyms aus Apoprotein und Cofaktor(en) kann statt der kompletten thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit auch nur das Apoprotein oder Cofaktor angebunden sein und die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit wird durch anschließende Rekonstitution mit den noch fehlenden Teilen komplettiert. Alternativ kann die Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche vor oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit erfolgen. Die Bindung des bereits modifizierten Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche, d. h. die Bindung an die Oberfläche nach der Anbindung der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer bzw. nach der Anbindung von Teilen der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, erfolgt ebenfalls wie unter a) bis c) in diesem Abschnitt beschrieben.

Bei der Herstellung der Test-Sites muß bei der Anbindung der Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche darauf geachtet werden, daß zwischen den einzelnen Nukleinsäure-Oligomeren ein genügend großer Abstand verbleibt, um zum einen den für eine Hybridisierung mit dem Target-Nukleinsäure-Oligomer nötigen Freiraum und zum anderen den für die Anbindung der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit nötigen Freiraum zur Verfügung zu stellen. Dazu bieten sich insbesondere drei verschiedene Vorgehensweisen (und Kombinationen daraus) an:

1. Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines hybridisierten Nukleinsäure-Oligomers, also eine Oberflächen-Derivatisierung mit hybridisiertem Probe-Nukleinsäure-Oligomer statt mit Einzelstrang-Probe-Oligonukleotid. Der zur Hybridisierung verwendete Nukleinsäure-Oligomer-Strang ist unmodifiziert (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a)–c) in diesem Abschnitt beschrieben). Anschließend wird der hybridisierte Nukleinsäure-Oligomer-Doppelstrang thermisch dehybridisiert, wodurch eine mit Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomer modifizierte Oberfläche mit größerem Abstand zwischen den Probe-Nukleinsäure-Oligomeren hergestellt wird.
2. Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomers, wobei während der Oberflächen-Derivatisierung mit Einzelstrang-Probe-Nukleinsäure-Oligomer ein geeigneter monofunktionaler Linker zugesetzt wird, der neben dem Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer ebenfalls an die Oberfläche gebunden wird (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a)–c) in diesem Abschnitt beschrieben). Der monofunktionale Linker hat eine Kettenlänge, die der Kettenlänge des Spacers zwischen der Oberfläche und dem Nukleinsäure-Oligomer identisch ist oder um maximal vier Kettenatome abweicht. Bei der Verwendung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer gemeinsam mit geeignetem monofunktionalem Linker zur Oberflächen-Derivatisierung wird der Nukleinsäure-Oligomer-Doppelstrang nach der gemeinsamen Anbindung des Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomers und des Linkers an die Oberfläche thermisch dehybridisiert.
3. Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Oligonukleotids, an das die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit bereits angebunden ist, wobei die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit einen Durchmesser von größer als 30 Å aufweist. Bei der Verwendung von Doppelstrang-Oligonukleotid wird der Oligonukleotid-Doppelstrang nach der Anbindung des Doppelstrang-Oligonukleotids an die Oberfläche thermisch dehybridisiert.

Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden

Vorteilhafterweise werden zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden mehrere Sonden-Nukleinsäure-Oligomere unterschiedlicher Sequenz auf einem Oligomer (DNA)-Chip aufgebracht, um die Sequenz eines beliebigen Target-Nukleinsäure-Oligomers oder einer (fragmentierten) Target-DNA zu detektieren bzw. um Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen. Dazu werden auf einer leitfähigen Oberfläche die Oberflächenatome oder -moleküle eines definierten Bereichs (einer Test-Site) mit DNA-/RNA-/PNA-Nukleinsäure-Oligomeren bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. Der DNA-Chip kann aber auch mit einem einzigen Sonden-Oligonukleotid derivatisiert werden. Als Sonden-Nukleinsäure-Oligomere werden Nukleinsäure-Oligomere (z. B. DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 50, bevorzugt der Länge 5 bis 30, besonders bevorzugt der Länge 8 bis 25 verwendet.

Es entsteht ein Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit, wobei "Einheit" repräsentativ für eine Elektromarkierung mit einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit steht. Die Ver-

brückungen können natürlich auch ohne Spacer oder mit nur einem Spacer (Elek-ss-oligo-Spacer-Einheit bzw. Elek-Spacer-ss-oligo-Einheit) durchgeführt werden.

In einem nächsten Schritt werden die Test-Sites mit der zu untersuchenden Nukleinsäure-Oligomer-Lösung (Target) in Kontakt gebracht. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, in dem die Lösung Nukleinsäure-Oligomer-Stränge enthält, die zu den an die leitfähige Oberfläche gebundenen Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind. In Fig. 2 ist die Sequenz der Elektron-Transfer-Schritte in Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-UQ(RC) im Detail gezeigt.

Aufgrund der Hybridisierung von Sonden-Nukleinsäure-Oligomer und dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang (Target) verändert sich die elektrische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Oberfläche und der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Somit kann ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch elektrochemische Verfahren wie z. B. Cyclovoltametrie, Amperometrie oder Leitfähigkeitsmessungen detektiert werden.

Bei der Cyclovoltametrie wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert. Ausgehend von einem Potential bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet, wird das Potential solange verändert bis die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Substanz oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom, dann einen Maximalstrom (Peak) und schließlich einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet.

Eine alternative elektrische Detektionsmethode, die Amperometrie, wird dadurch ermöglicht, dass die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit durch Anlegen eines geeigneten, konstant gehaltenen Elektrodenpotentials zwar elektrooxidiert (elektroreduziert) werden kann, die Rereduktion (Reoxidation) der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit in den ursprünglichen Zustand aber nicht wie in der Cyclovoltametrie durch Änderung des Elektrodenpotentials erfolgt, sondern durch ein der Targetlösung zugesetztes geeignetes Reduktionsmittel (Oxidationsmittel), der "redoxaktiven Substanz", wodurch der Stromkreis des Gesamtsystems geschlossen wird. Solange solches Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) vorhanden ist bzw. solange das verbrauchte Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) an der Genelektrode rereduziert (reoxidiert) wird, fließt Strom, der amperometrisch detektiert werden kann und der proportional zur Zahl der Hybridisierungsereignisse ist.

Die Redoxaktivität der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit wird erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge ausgelöst. Diese Eigenschaft wird dadurch ausgenutzt, dass die elektrochemische Detektion erst durch Einstrahlen von Licht auf das Oberflächenhybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Einheit (Oberflächenhybrid mit hybridisiertem Target) ausgelöst wird und maximal solange aufrechterhalten wird wie die Lichteinstrahlung andauert. Insbesondere bei der amperometrischen Detektion fließt somit unter bestimmten äußeren Umständen erst dann (längeranhaltend) Strom, wenn Licht auf das Oberflächenhybrid eingestrahlt wird.

Solche äußere Umstände sind z. B. die Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels (bzw. Oxidationsmittels), um einen durch Photoinduktion gebildeten, oxidierten Donor D^+ (bzw. reduzierten Akzeptor A^-) der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit zu reduzieren (bzw. zu oxidieren) und das Anlegen eines Potentials an der Elektrode, bei dem zwar ein durch Photoinduktion gebildeter reduzierter Akzeptor A^- (bzw. oxidierte Donor D^+) der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit, nicht jedoch der nicht reduzierte Akzeptor A (bzw. der nicht oxidierte Donor D) oxidiert (bzw. reduziert) werden kann. Somit kann die Detektion bei Verwendung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit auf ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe des Oligomer-Chips räumlich beschränkt werden, indem das Licht auf dieses Test-Site oder auf diese Test-Site-Gruppe begrenzt wird. Es können also verschiedene Test-Sites (Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen) eines Oligomer-Chips auf eine gemeinsame, durchgängige, elektrisch leitende Oberfläche aufgebracht werden. Ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe kann einfach durch Anlegen eines geeigneten äußeren Potentials an die (gesamte) Oberfläche bei Lichteinstrahlung auf genau dieses Test-Site oder diese Test-Site Gruppe adressiert und amperometrisch detektiert werden. Die verschiedenen Test-Sites müssen also nicht auf einzelnen, elektrisch voneinander isolierten und zum Anlegen eines Potentials und Auslesen des Stroms einzeln ansteuerbaren (Mikro-) Elektroden aufgebracht werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

Fig. 1 Schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen mittels amperometrischer Detektion;

Fig. 2 Schematische Darstellung der photoinduzierten amperometrischen Meßmethode am Beispiel des Oberflächen-Hybrids Elek-Spacer-ssoligo-Spacer-MQ(RC); hv: Einstrahlung von Licht, P: primärer Donor des RC, MQ: Menachinon-50, Elektron Akzeptor in der Q_A -Protein-Bindungstasche des RC, Red/Ox: reduzierte bzw. oxidierte Form der freien, der Targetlösung zugesetzten redoxaktiven Substanz, z. B. $cyt\ c_2^{2+}$, Natriumascorbat oder $Fe(CN)_6^{2+}$, die die oxidierte Form P^+ in den ursprünglich neutralen Zustand P rereduzieren können, E_{ox} : Potential der Elektrode, bei dem MQ durch Elektronabgabe an die Elektrode zu MQ oxidiert wird, "hv an": Beginn der Lichteinstrahlung, "hv aus": Ende der Lichteinstrahlung.

Wege zur Ausführung der Erfindung

Eine Bildungseinheit einer exemplarischen Test-Site mit hybridisiertem Target, $Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-MQ(RC) der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Einheit ist schematisch in Fig. 2 dargestellt. Unter Bildungseinheit wird die kleinste sich wiederholende Einheit einer Test-Site verstanden. Die Elektromarkierung im Beispiel der Fig. 2 ist das Reaktionszentrum (RC) der Photosynthese betreibenden Bakterien *Chloroflexus aurantiacus*, ein thermo-

stabiles, photoinduzierbar redoxaktives Protein bestehend aus Apoprotein und Cofaktoren. Das Reaktionszentrum aus Chloroflexus aurantiacus kann durch einfache Manipulation von den beiden Menachinon-Cofaktoren in der Q_A - bzw. Q_B -Bindungstasche befreit werden (Gunner et al., Journal of Physical Chemistry, 1986, Vol. 90, S. 3783-3795), so dass man Menachinon getrennt vom restlichen RC (Apoprotein einschließlich aller Cofaktoren außer Menachinon in der Q_A - bzw. Q_B -Bindungstasche) erhält. Das RC ist über seinen Cofaktor Menachinon-50 (MQ) in der sogenannten Q_A -Bindungstasche des RCs kovalent mit dem Oligonukleotid verbunden, wobei zuerst freies MQ mit einer reaktiven Carbonsäuregruppe versehen wird, dann freies MQ über diese Carbonsäure-Gruppe kovalent an das Sonden-Oligonukleotid angebunden wird und schließlich das restliche RC (Apoprotein mit allen Cofaktoren außer MQ) an MQ rekonstituiert wird.

Das Sonden-Oligonukleotid ist in der Nähe der beiden Enden jeweils über einen (beliebigen) Spacer mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen versehen. Das so modifizierte Sonden-Oligonukleotid wird in Gegenwart eines monofunktionalen Linkers gemeinsam mit dem monofunktionalen Linker kovalent an die Elektrode angebunden, wobei darauf geachtet wird, dass genügend monofunktionaler Linker geeigneter Kettenlänge zugesetzt wird, um zwischen den einzelnen Sonden-Oligonukleotiden genügend Freiraum für eine Hybridisierung mit dem Target-Oligonukleotid und für die Anbindung der redoxaktiven Einheit zur Verfügung zu stellen. Danach wird an die freie, spacerverbrückte, reaktive Gruppe des Sonden-Oligonukleotids MQ, das vorher mit einer passenden reaktiven Kopplungsgruppe versehen wurde, angebunden. Im letzten Schritt dieser Reaktionssequenz wird dann das restliche RC (Apoprotein mit allen Cofaktoren außer MQ) an MQ rekonstituiert.

Die elektrische Kommunikation zwischen der leitfähigen Oberfläche und der über ein Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist schwach oder gar nicht vorhanden. Durch Behandlung der Test-Site(s) mit einer zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung, kommt es, im Falle der Hybridisierung zwischen Sonde und Target, zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Oberfläche und der über ein Doppelstrang-Oligonukleotid verbrückten thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit.

Durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge auf das RC wird der Cofaktor P, der sogenannte primäre Donor, elektronisch angeregt und es kommt innerhalb der Cofaktoren des RCs zur photoinduzierten Ladungstrennung, wobei ein Elektron vom angeregten primären Donor P^* auf das MQ in der Q_A -Bindungstasche übertragen wird. Liegt an der Elektrode ein geeignetes Potential an, um vom reduzierten Menachinon (MQ^-) ein Elektron auf die Elektrode zu übertragen, kommt es im Falle des nicht mit Target-Oligonukleotid hybridisierten Sonden-Oligonukleotids trotzdem zu keinem Stromfluß, da die Leitfähigkeit des ss-Oligonukleotids in $Au-S(CH_2)_2$ -ss-oligo-Spacer-MQ(RC) sehr gering oder überhaupt nicht vorhanden ist. Im hybridisierten Zustand ($Au-S(CH_2)_2$ -ds-oligo-Spacer-MQ(RC)) jedoch ist die Leitfähigkeit hoch, ein Elektron kann von MQ^- zur Elektrode übertragen werden (unter Bildung von MQ) und bei Anwesenheit einer geeigneten redoxaktiven Substanz, die P^+ zu P reduziert, wird der Stromkreis geschlossen und weitere Lichtabsorption durch das RC startet den Zyklus erneut. Dies äußert sich amperometrisch in einem deutlichen Stromfluß zwischen Elektrode und photoinduzierbar redoxaktiver Einheit (Fig. 2). Damit ist es möglich, die sequenzspezifische Hybridisierung des Targets mit den Sonden-Oligonukleotiden durch Amperometrie lichtinduziert zu detektieren.

Da die Redoxaktivität der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit – auch bei passendem Elektrodenpotential – erst durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge ausgelöst und maximal solange aufrechterhalten wird, wie die Lichteinstrahlung andauert, kann ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe eines Oligomer-Chips räumlich aufgelöst werden, indem das Licht auf dieses Test-Site oder auf diese Test-Site-Gruppe begrenzt wird. Dies birgt den Vorteil, dass die verschiedenen Test-Sites (Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen) eines Oligomer-Chips auf eine gemeinsame, durchgängige, elektrisch leitende Oberfläche aufgebracht werden können und ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppen einfach durch Anlegen eines geeigneten äußeren Potentials an die (gesamte) Oberfläche bei Lichteinstrahlung nur auf genau dieses Test-Site oder diese Test-Site Gruppe adressiert und amperometrisch detektiert werden kann. Die verschiedenen Test-Sites müssen also nicht auf einzelnen, elektrisch voneinander isolierten und zum Anlegen eines Potentials und Auslesen des Stroms einzeln ansteuerbaren (Mikro-) Elektroden aufgebracht werden.

Daneben können fehlerhafte Basenpaarungen (Basenpaar Mismatches) durch eine geänderte cyclovoltammetrische Charakteristik erkannt werden. Ein Mismatch äußert sich in einem größeren Potentialabstand zwischen den Strommaxima der Elektroreduktion und der Elektroreoxidation (Umkehrung der Elektroreduktion bei umgekehrter Potentialvorrichtung) bzw. der Elektrooxidation und Elektroreduktion in einem cyclovoltammetrisch reversiblen Elektronentransfer zwischen der elektrisch leitenden Oberfläche und der thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit. Dieser Umstand wirkt sich vor allem in der amperometrischen Detektion günstig aus, da dort der Strom bei einem Potential getestet werden kann, bei dem zwar das perfekt hybridisierende Oligonukleotid-Target signifikant Strom liefert, nicht aber das fehlerhaft gepaarte Oligonukleotid-Target.

Beispiel 1

Darstellung eines Menachinon-Derivats mit reaktiver Carbonsäuregruppe

1 g Menachinon-4 (Vitamin K₂, 2-Methyl-3-(tetra-isoprenyl)-1,4-naphtochinon, Sigma-Aldrich) wird in 250 ml THF/100 ml H₂O gelöst. Danach wird unter Inertgasatmosphäre 2,4 g N-Brom-Hydroxysuccinimid (NBS) zugegeben, und das Reaktionsgemisch unter Inertgasatmosphäre bei 0°C 1,30 h unter Rühren inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit Essigsäureethylester ausgeschüttelt, mehrmals mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und der Essigsäureethylester bei reduziertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und mit Kieselgel-DC-Platten (Laufmittel Hexan: Essigsäureethylester, 3 : 1) gereinigt. Das Produkt (Addition von HOBr an die ω -Doppelbindung der Tetra-isoprenyl-Seitenkette, Rf ca. 0,4) wird in Toluol: Methanol: Hexan (1 : 3 : 1) gelöst, bei 0°C unter Inertgas mit 600 mg K₂CO₃, 50 mg pyro-Gallol und ca. 10 mg Ascorbat versetzt und unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur 2 h unter Rühren inkubiert. Das Folgeprodukt (Epoxid-Bildung aus dem HOBr-Additionsprodukt

an die ω -Doppelbindung der γ -Isoprenyl-Seitenkette) wird, wie oben erwähnt über Acetall und Kieselgel-DC (Rf ca. 0.3) isoliert, gereinigt und anschließend vom Epoxid zum Diol umgesetzt (Lösen in THF und bei 0°C unter Inertgas 4 ml H_2SO_4 : THF (1 : 9) und ca. 5 mg Ascorbat zugeben und 2 h rühren). Das Diol wird, wie oben beschrieben, isoliert und gereinigt (Rf ca. 0.15). Anschließend wird das Diol mit 2M H_2SO_4 zum Aldehyd und mit Cr(VI)-Oxid schließlich zur Carbonsäure oxidiert (Standardverfahren).

Beispiel 2

Isolierung von Reaktionszentren aus *Chloroflexus aurantiacus*

Zur Isolierung der Reaktionszentren werden Zellen von *Chloroflexus aurantiacus*, Stamm J-10-f1, verwendet. Die Bakterien werden mit Tris-Puffer (10 mM Tris, pH = 9, 1 ml/g) suspendiert und im Potter homogenisiert. Nach Zusatz einer Spatelspitze DNase werden die Zellen im Sonifier (Sonifier W-450, duty cycle 70%, output control 7) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen werden pelletiert (Zentrifugation bei 10500 g für 30 min), der verbleibende Überstand wird anschließend bei 200000 g zentrifugiert. Das abzentrifugierte Pellet dieser Ultrazentrifugation enthält die Chromatophore (RCs in Membranen). Das Pellet wird in Tris-Puffer (10 mM), pH = 9 resuspendiert (bis zu einer optischen Dichte der Suspension von OD 12–14/cm bei 865 nm), mit 0.7% LDAO versetzt und für 1 h bei 4°C gerührt. Anschließend werden die aufgeschlossenen RCs durch Ultrazentrifugation abgetrennt (1 h bei 200000 g). Der Überstand enthält neben den RCs auch freies Bakteriochlorophyll a und c und Carotinoid, farbloses Protein, Cytochrom c_{544} und andere niedermolekulare Verbindungen. Zur Aufreinigung wird der Überstand auf eine DEAE-Sephacel-Säule (Pharmacia, 300 \times 26 mm) gegeben, die mit 10 mM Tris, pH = 9 equilibriert wurde. Die Säule wird mit 10 mM Tris, pH = 9, 0.3% LDAO gewaschen bis das Eluat farblos ist. Anschließend wird mit 10 mM Tris, pH = 9, unter Zusatz von 0.1% LDAO und 30 mM NaCl gewaschen. Die vorgereinigten RCs werden schließlich mit 10 mM Tris, pH = 9 unter Zusatz von 0.1% LDAO und 60 mM NaCl eluiert, auf das 3 fache mit 10 mM Tris, pH = 9, 0.1% LDAO verdünnt und die chromatographische Reinigung auf einer kleineren DEAE-Sephacel-Säule (Pharmacia, 100 \times 16 mm) wiederholt. Vergleiche auch Aebersold, R. H. et al. 1986, J. Biol. Chem., Vol. 261, 4229–4238 und Shiozawa, J. A. et al. 1987, Biochemistry, Vol. 26, 8354–8359.

Beispiel 3

Entfernen der Chinon-Cofaktoren aus den isolierten Reaktionszentren aus *Chloroflexus aurantiacus*

Zur Entfernung der Chinon-Cofaktoren aus den isolierten Reaktionszentren (RCs) werden die RCs in TL-Puffer (10 mM Tris, 0.1% LDAO, pH = 8) auf eine mit TL-Puffer equilibrierte DEAE-Cellulose Säule gegeben, mit einer auf 30°C temperierten Lösung aus 4 Vol.% LDAO (Lauryldimethyl-N-oxid), 10 mM Phenanthrolin, 1 mM Dithiothreitol in TL-Puffer gespült (40 ml Lösung pro mmol RC) und anschließend die chinonbefreiten RCs mit TL-Puffer, der mit 300 mM NaCl versetzt ist, von der Säule gewaschen. Vergleiche auch Gunner, M. R. et al, 1986, Journal of Physical Chemistry, Vol. 90, S. 3783–3795.

Beispiel 4

Herstellung der Oligonukleotid Elektrode $\text{Au-S}(\text{CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-UQ(RC)}$

Die Herstellung von $\text{Au-S}(\text{CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-UQ(RC)}$ gliedert sich in 4 Teilabschnitte, nämlich der Darstellung der leitfähigen Oberfläche, der Derivatisierung der Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid in Gegenwart eines geeigneten monofunktionalen Linkers (Inkubationsschritt), der kovalenten Anbindung des modifizierten Ubichinons (Redoxschritt) und der Rekonstitution des restlichen RCs (Rekonstitutionsschritt).

Das Trägermaterial für die kovalente Anbindung der Doppelstrang-Oligonukleotide bildet ein ca. 100 nm dünner Gold-Film auf Mica (Muskovit Plättchen). Dazu wurde in einer elektrischen Entladungskammer frisch gespaltenes Mica mit einem Argonlonenplasma gereinigt und durch elektrische Entladung Gold (99.99%) in einer Schichtdicke von ca. 100 nm aufgebracht. Anschließend wurde der Gold-Film mit 30% H_2O_2 /70% H_2SO_4 von Oberflächenverunreinigungen befreit (Oxidation organischer Ablagerungen) und für ca. 20 Minuten in Ethanol getaucht, um an der Oberfläche adsorbierten Sauerstoff zu verdrängen. Nach Abspülen der Oberfläche mit bidestilliertem Wasser wird auf die horizontal gelagerte Oberfläche eine vorher bereitete 1×10^4 molare Lösung des (modifizierten) Doppelstrang-Oligonukleotids aufgetragen, so daß die komplette Gold-Oberfläche benetzt wird (Inkubationsschritt, siehe auch unten).

Zur Inkubation wurde ein doppelt modifiziertes 12 Bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-TAGTCG-GAAGCA-3' verwendet, das an der Phosphatgruppe des 3' Endes mit $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2\text{-S})_2$ zum $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ verestert ist. Am 5'-Ende ist die endständige Base Thymin des Oligonukleotids am C-5 Kohlenstoff mit $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ modifiziert. Zu einer 2×10^4 molaren Lösung dieses Oligonukleotids in HEPES-Puffer (0,1 molar in Wasser, pH 7.5 mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB, siehe Abkürzungen) wurde ca. 10^{-4} bis 10^{-1} molar 2-Hydroxy-mercaptoethanol gegeben (oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linker geeigneter Kettenlänge) und die Gold-Oberfläche eines Test-Sites komplett benetzt und 2–24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S}-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1 : 1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie 2-Hydroxy-mercaptoethanol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt).

Die so mit einer Monolayer aus ss-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol modifizierte Goldelektrode wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 3×10^{-3} molarem Chinon aus Beispiel 1,

10^{-2} molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES-Puffer (0,1 molar (in 10^{-2} M), pH = 7.5), benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1 h bilden der $-CH=CH-CO-NH-CH_2-CH_2-NH_2$ Spacer und das modifizierte Chinon eine kovalente Bindung aus (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der Säurefunktion des modifizierten UQ-50, Redoxschritt).

Anschließend wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von ca. 5×10^{-5} molarem Ubichinon-50-freien RCs in 10 mM Tris, pH = 8, mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB bei ca. 4°C für ca. 12 h inkubiert, um das restliche RC an das Oligonukleotid-gebundene modifizierte UQ-50 zu rekonstituieren (Rekonstitutionsschritt).

Beispiel 5

Vergleich der thermischen Stabilität von Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides*, *Chromatium tepidum* und *Chloroflexus aurantiacus*

Die thermische Stabilität von Reaktionszentren aus *Chromatium tepidum*, *Chloroflexus aurantiacus* und *Rhodobacter sphaeroides* wurde absorptionsspektroskopisch untersucht. Dazu wurden die isolierten RCs aus den verschiedenen Bakterien in TL-Puffer (20 mM Tris, 0.1% LDAO, pH = 8 für *Rhodobacter sphaeroides* bzw. pH = 8.5 für *Chromatium tepidum* und *Chloroflexus aurantiacus*) gelöst, die optische Dichte der RC-Lösungen auf OD = 1/cm bei 865 nm eingestellt und in eine temperierbare Küvette gefüllt. Die 865 nm Bande der RCs ist sensitiv für die Funktionalität der RCs, i. e. bei einem Funktionsverlust durch Denaturierung der RCs verschwindet diese Absorptionsbande zu mehr als 98%.

Die Temperatur wurde über einen umwälzbaren externen Thermostat eingestellt und die Absorption bei 865 nm in einem PE Lambda 40 Spektralphotometer über 2 h (Absorptionsmessungen alle 1 Minute) aufgenommen. Solche temperaturabhängigen Absorptionsmessungen wurden, beginnend bei 20°C, in 2°C-Schritten wiederholt. Die Thermostabilitäts-Temperatur T_T der RCs wird als diejenige Temperatur definiert, bei der die Absorption bei 865 nm zum ersten mal unter 92% der ursprünglichen Absorption (bei 20°C) gefallen ist. Das Reaktionszentrum *Chloroflexus aurantiacus* ist bis ca. 60°C stabil ($T_T = 62^\circ\text{C}$), dasjenige aus *Chromatium tepidum* bis ca. 50°C ($T_T = 48^\circ\text{C}$). RCs aus *Rhodobacter sphaeroides* besitzen eine thermische Stabilität bis ca. 40°C ($T_T = 40^\circ\text{C}$). Vergleiche auch Nozawa, T.; Madigan, M. T.: J. Biochem. (1991) 110, 588–594.

Patentansprüche

1. Durch Anbindung einer thermostabilen, photoinduzierbar redoxaktiven Einheit modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, **dadurch gekennzeichnet**, dass die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit bis zu einer Temperatur von wenigstens 40°C thermisch stabil ist.
2. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit bis zu einer Temperatur von wenigstens 50°C thermisch stabil ist.
3. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit bis zu einer Temperatur von wenigstens 60°C thermisch stabil ist.
4. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein thermostabiles, photoinduzierbar redoxaktives Protein oder Enzym ist.
5. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die thermostabile, photoinduzierbar redoxaktive Einheit ein thermostabiles photosynthetisches Reaktionszentrum ist.
6. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das thermostabile photosynthetische Reaktionszentrum ein thermostabiles photosynthetisches bakterielles Reaktionszentrum ist.
7. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das thermostabile photosynthetische bakterielle Reaktionszentrum ein Reaktionszentrum der Chloroflexaceae ist.
8. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionszentrum der Chloroflexaceae ein Reaktionszentrum aus *Chloroflexus aurantiacus* ist.
9. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das thermostabile photosynthetische bakterielle Reaktionszentrum ein Reaktionszentrum der Chromatiaceae ist.
10. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionszentrum der Chromatiaceae ein Reaktionszentrum aus *Chromatium tepidum* ist.
11. Verwendung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach einem der vorhergehenden Ansprüche in einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Detektion cyclovoltametrisch, amperometrisch oder durch Leitfähigkeitsmessung erfolgt.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

BEST AVAILABLE COPY

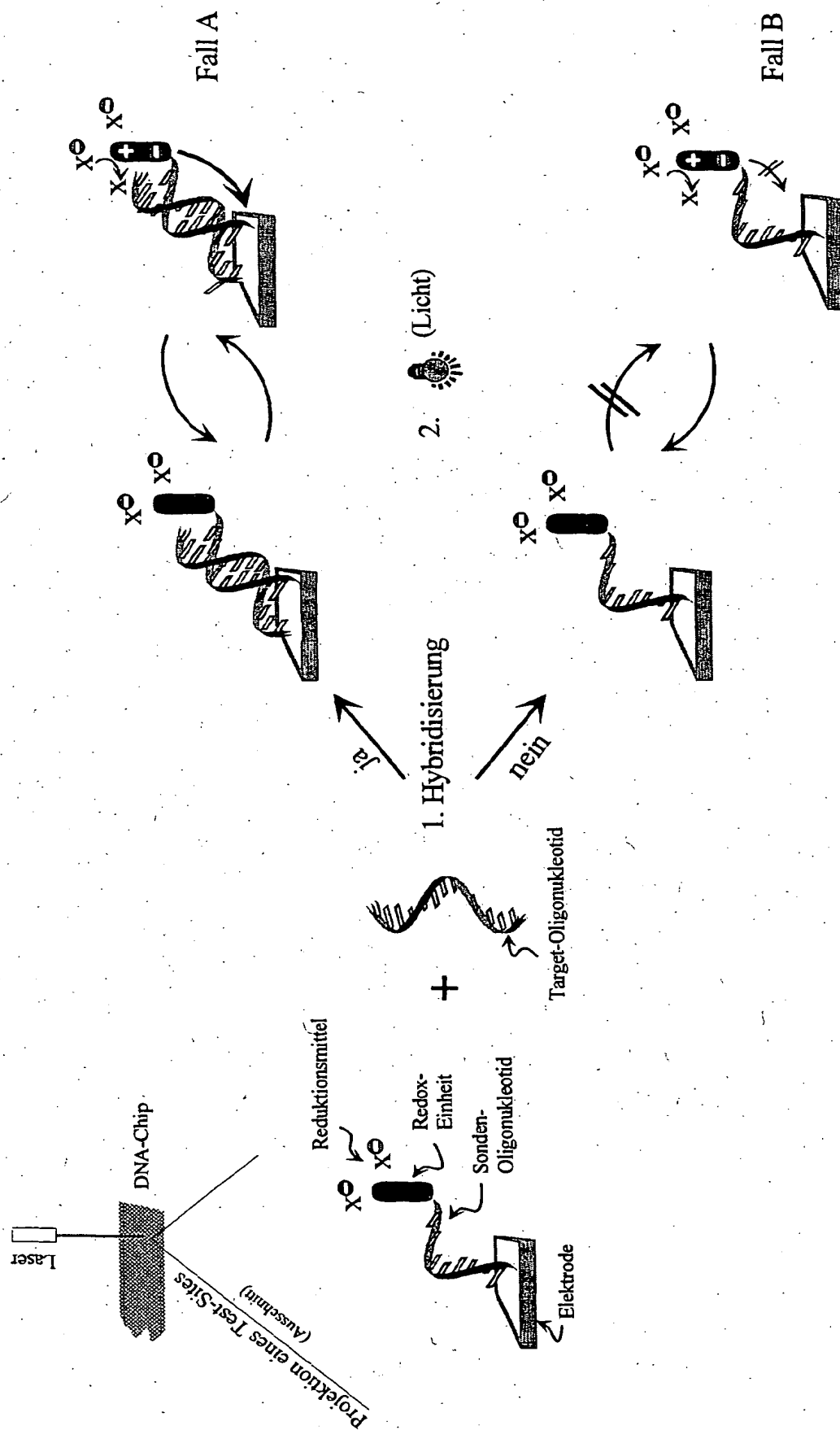


Fig. 1

Fig. 2

